

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif untuk mengetahui variasi genetik beberapa varietas mangga berdasarkan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan penanda molekuler gen PSY. Primer RAPD yang digunakan sebanyak 3 primer yaitu OPA 12, OPA 13, dan OPL 17, sedangkan primer gen PSY didesain dari gen PSY (*Phytoene Synthase*) mangga Jinhuang Cina (kode akses NCBI. JQ277716.1). Empat sampel varietas mangga dipilih berdasarkan warna kulit buahnya yang mewakili kandungan beta karoten dalam buah (tabel 3.2).

Tabel 3.2 Daftar sampel varietas mangga yang digunakan

Sampel	Nama Varietas
Mangga berkulit buah merah	Garifta merah
Mangga berkulit buah oranye	Gedong Gincu
Mangga berkulit buah kuning	Podang Kuning
Mangga berkulit buah hijau	Arumanis

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai November 2014. Sampel daun empat varietas mangga diperoleh dari kebun percobaan dan koleksi plasma nutfah mangga Cukurgondang Kecamatan Grati Kabupaten Pasuruan. Penelitian analisis variasi genetik berdasarkan RAPD dan amplifikasi gen PSY beberapa varietas mangga dilakukan di laboratorium Genetika dan Biologi

Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah plastik klip, gunting, alat tulis, tabung nitrogen cair, mortar, sarung tangan, masker, timbangan analitik, tabung *eppendorf* ukuran 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, rak tabung *eppendorf*, mikropipet (5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l), *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, gelas ukur, erlenmeyer, tabung vorteks, erlenmeyer, *waterbath*, alat sentrifugasi, spektrofotometer seri BioRAD SmartspecTM Plus, kuvet DNA, mesin *thermal cycler* seri BioRAD, tabung *thin wall* ukuran 0,2 ml, rak tabung *thin wall*, *hotplate* dan *stirrer* perangkat elektroforesis horizontal merk BioRAD, UV *transiluminator* seri BioRAD molecular Imager Gel DocTMXr *imaging system*, autoklaf, inkubator, lemari es, dan *freezer*.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel daun mangga (tabel 3.1), ddH₂O, dH₂O, *tissue*, larutan buffer lisis CTAB 4% (terdiri dari NaCl 3 mol/L, β -Mercaptoethanol 0,3%, EDTA 20mmol/L, Tris-HCl 100 mmol/L pH 8, PVP 0,025 g/ml dan aquades steril), fenol, *Chloroform Isoamil Alkohol*, EtOH 70% dan 100%, RNase, *Chloroform: Isoamil alcohol* (24:1), TBE (*Tris Borac Acid* terdiri dari 89mM Tris-Cl, 89mM Borate dan 2mM EDTA solution), gel agarose, *green master mix* promega (Reaction buffer pH 8.5, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP and 3 mM MgCl₂), Intron PCR master mix, DNA

ladder 1Kb Fermentas, *etidhium bromida*, primer gen PSY mangga, primer RAPD OPA 12, OPA 13 dan OPL 17 (Tabel 3.3).

Tabel 3.3 Sekuen primer RAPD yang digunakan (Eurofins genomics, 2014)

No	Primer	Sekuen 5'-3'
1	OPA 12	TCGGCGATAG
2	OPA 13	GGGGTGACGA
3	OPL 17	GCCTGAGCCC

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pengambilan dan Persiapan Sampel Daun

Daun yang dijadikan sampel untuk isolasi DNA adalah daun muda yang masih segar. Sampel daun dimasukkan ke dalam plastik klip yang telah diberi label nama varietas mangga kemudian dimasukkan ke dalam *ice box* selama perjalanan agar tetap segar. Setelah itu, sampel daun dibersihkan dengan tisu yang telah dibasahi alkohol 70%. Sampel daun diambil secukupnya untuk isolasi DNA sedangkan sisanya disimpan di plastik klip dan diberi silika gel.

3.4.2 Isolasi DNA Genomik Mangga

Metode isolasi DNA dari daun mangga berdasarkan protokol isolasi DNA dari Doyle and Doyle dengan metode CTAB yang dimodifikasi (Azmat *et. al*, 2012). Sampel daun yang telah bersih digerus dengan mortar menggunakan nitrogen cair sampai benar-benar halus. Hasil daun yang telah digerus ditimbang 0,1 gr di tabung *eppendorf* ukuran 2 ml. Sampel daun yang telah dimasukkan ke tabung *eppendorf* diberi buffer lysis CTAB 4% yang telah diinkubasi pada suhu 65° C sebanyak 700 µl, campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65° C selama 60-80 menit. Sampel ditambah fenol sebanyak 1x volume, lalu campuran disentrifugasi pada 13000 rpm selama 10 menit pada suhu

4°C. Supernatan dipindah ke tabung eppendorf baru ukuran 1,5 ml. Supernatan tersebut ditambah *chloroform-isoamyl alcohol* (24:1) 1/10 volume, dihomogenkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatant yang dihasilkan diambil dengan hati-hati kemudian ditambah 0,1 volume ammonium asetat dan 2,5 volume ethanol absolut. Suspensi tersebut diinkubasi semalam pada suhu -20°C. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan dicuci dengan ethanol 70% sebanyak dua kali. Pellet yang telah dicuci dengan ethanol kemudian dikering anginkan. Pelet ditambah aquabides 20µl. Stok DNA ini disimpan pada suhu -20° C.

3.4.3 Repurifikasi DNA

Stok DNA hasil isolasi diberi RNase 1µl dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam. Setelah itu, suspensi diberi kloroform isoamil alcohol 200 µl dan dihomogenkan secara perlahan. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm kemudian supernatant dipindah ke tabung eppendorf baru. Ditambahkan 1/10 volum NaCl 3 M pada supernatant, dihomogenkan supernatan, lalu ditambahkan ethanol 100 % dingin. Disentrifugasi suspensi tersebut selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pellet dicuci dengan ethanol 70%. Pellet dikering anginkan lalu dilarutkan dengan 20 µl TE dingin (Azmat *et. al*, 2012).

3.4.4 Uji Kemurnian DNA secara Kualitatif dan Kuantitatif

Pengujian kemurnian DNA secara kualitatif yaitu dengan elektroforesis horizontal. Elektroforesis dilakukan pada gel agarose 1%. Pada setiap sumuran

diisi 3µl DNA stok dan 1µl *loading dye*. Kemudian elektroforesis *dirunning* dalam buffer TBE 1x pada tegangan 70 volt selama 60 menit. Setelah itu, gel agarose direndam dalam *etidumbromida* selama 15 menit dan divisualisasi dengan *UV Transiluminator*.

Pengujian kemurnian DNA secara kuantitatif yaitu dengan menggunakan alat spektrofotometer. DNA stok diambil sebanyak 1 µl ke dalam kuvet kemudian ditambah aquabides sebanyak 349 µl. Sampel DNA kemudian dibaca nilai absorbansinya pada λ 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA dapat diketahui dari nilai absorbansi 260 nm. Kemurnian DNA dapat diketahui dari perbandingan hasil absorbansi pada 260 nm dan 280 nm ($A_{260}:A_{280}$). Perbandingan nilai absorbansi DNA yang murni yaitu antara 1,8 – 2 (Azmat *et. al*, 2012).

3.4.5 Desain Primer

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen PSY mangga pada penelitian ini didesain berdasarkan urutan nukleotida gen PSY mangga varietas Jinhuang dari Cina (GeneBank: JQ277716.1). Primer 1 didesain dari kodon start AUG sedangkan primer 2 didesain berdasarkan daerah sekuen yang terkonservasi pada gen PSY mangga varietas Jinhuang dengan beberapa tanaman sesuai dengan ketentuan desain primer (tabel 3.4). Hasil desain primer dapat dilihat pada tabel 3.5.

Tabel 3.4 Ketentuan desain primer

Kriteria	Ketentuan
Panjang basa	Antara 18-23 basa
Temperatur annealing (TA)	1) Antara 55-60°C 2) 5°C di bawah temperatur melting (TM) 3) $TM = 4(G+C)+2(A+T)$
Persentase G dan C	Antara 45-60 %

Tabel 3.5 Hasil sekuen basa primer yang telah didesain

Sumber	Primer		Sequence 5'- 3'	Temperatur annealing (°C)	
				Berdasar perhitungan rumus tabel 3.3	Rekomendasi dari pabrik
Sequence gen PSY mangga Jinhuang (<i>GeneBank</i> : JQ277716.1)	Primer 1	Forward	ATGTCTGTGGC TTTGCTATGG	57	50.4
		Reverse	TAACAGTGCTT TTCTGGAGGG	57	50
Wilayah konserv gen PSY pada mangga Jinhuang (<i>GeneBank</i> : JQ277716.1) dengan berbagai tanaman	Primer 2	Forward	TGAAGCAGGC AGCCTTGGT	55	50.5
		Reverse	GCATCCTCTCC AACATCCC	55	50.5

3.4.6 Amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

3.4.6.1 Amplifikasi DNA Berdasarkan RAPD

Sampel DNA yang akan diamplifikasi diambil dari stok kerja DNA yang konsentrasinya telah diencerkan dengan ddH_2O menjadi 1600 ng. Untuk setiap tabung PCR berisi 25 μL campuran yang terdiri dari :

Tabel 3.6 Komponen PCR dalam satu tabung untuk amplifikasi dengan primer RAPD

No	Komponen PCR	Konsentrasi awal	Volume (μL)	Konsentrasi akhir
1	Green Master Mix	2x	12,5	1x
2	Primer forward	20 ng	1,5	1,2 ng
3	Nuclease-Free Water		10	
4	DNA	1600	1	64 ng
	Volume Akhir		25	

Pengkondisian suhu dan waktu PCR dengan teknik RAPD disesuaikan dengan penelitian Manchekar (2008) amplifikasi RAPD pada mangga Alfonso. Denaturasi awal 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus terdiri dari tahap denaturasi 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 36°C selama 30 detik, *extension* pada suhu 72°C selama 2 menit. Setelah itu sintesis tambahan 72°C selama 7 menit dan akhir dari seluruh siklus dikondisikan pada suhu tetap 4°C.

3.4.6.2 Amplifikasi Gen PSY

Sampel DNA yang akan diamplifikasi diambil dari stok kerja DNA yang konsentrasinya telah diencerkan dengan ddH_2O menjadi 1600 ng. Untuk setiap tabung PCR berisi 20 μL campuran yang terdiri dari :

Tabel 3.7 Komponen PCR dalam satu tabung untuk amplifikasi gen PSY

No	Komponen PCR	Konsentrasi awal	Volume (μL)	Konsentrasi akhir
1	Intron PCR Mix	2x	10	1x
2	Primer forward	20 ng	2	2 ng
3	Primer reverse	20 ng	2	2 ng
4	Nuclease-Free Water		5	
5	DNA	1600	1	160 ng
	Volume Akhir		20	

Tahap amplifikasi DNA dimodifikasi dari amplifikasi gen PSY pada tanaman pisang (Mlalazi, 2010). Kondisi PCR terdiri dari denaturasi awal 95°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus terdiri dari tahap denaturasi 97°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu antara 50-60 °C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Setelah itu sintesis tambahan 72°C selama 8 menit dan akhir dari seluruh siklus dikondisikan pada suhu tetap 4°C.

3.4.7 Elektroforesis DNA Hasil PCR

DNA hasil amplifikasi PCR sebanyak 3 μ L dielektroforesis pada 2% gel agarose dengan tegangan listrik 80 volt selama 60 menit. Marker yang digunakan adalah *gene ruler* 100 bp plus Fermentas dan DNA ladder 1 Kb Vivantis sebanyak 3 μ l. Setelah itu gel agarose direndam dalam *etidumbromida* selama 15 menit dan divisualisasikan pada UV *transiluminator*.

3.4.8 Analisis Data

3.4.8.1 Analisis Variasi Genetik Berdasarkan RAPD

Analisis dilakukan dengan pemberian skor untuk pita-pita yang muncul. Skor 1 diberi untuk pita yang muncul dan untuk pita yang tidak muncul diberi skor 0. Selanjutnya, data skoring dianalisa dengan Popgen versi 1.32 untuk menghitung persentase pita polimorfik, variasi genetik dan jarak genetik sedangkan analisa dengan menggunakan Software NTSYS-pc (*Numerical Taxonomic System*) Versi 2.0.1 digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan. Indeks similaritas dihitung berdasarkan koefisien perhitungan Similarity of Qualitative Data (SYMQUAL). Analisis kluster dibuat dengan perhitungan *Sequential Aglomerative Heirarchical and Nested* (SAHN) berdasarkan *un-weighted pair group method with aritmatical averages* (UPGMA) dari indeks similaritas. Hasil dari analisis kluster disajikan dalam bentuk dendrogram.

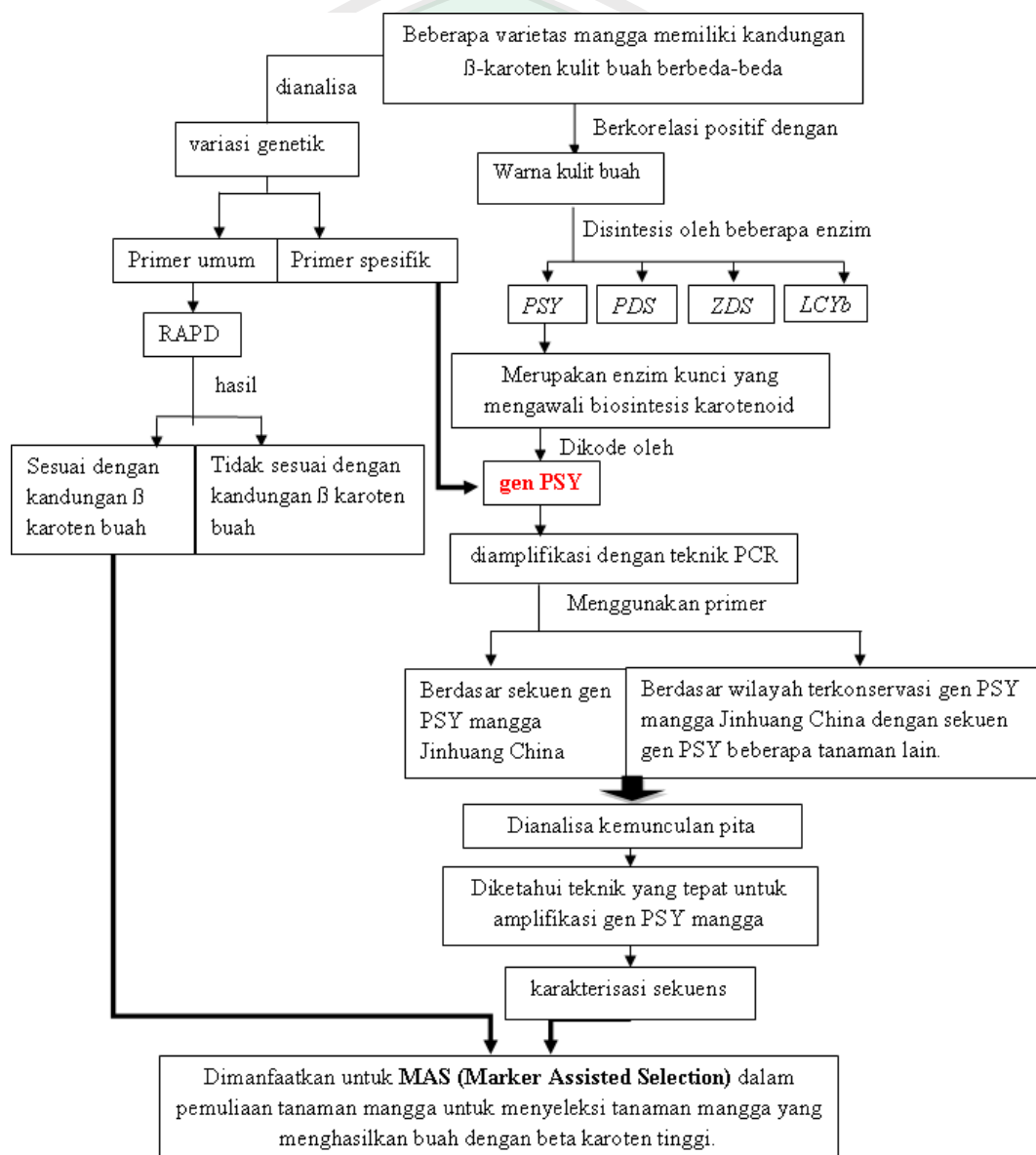
3.4.8.2 Analisis Data Hasil Amplifikasi Gen PSY

Pita hasil elektroforesis dibandingkan dengan DNA *ladder* untuk mengetahui panjang basa yang berhasil diamplifikasi saat PCR. Masing-masing primer yang telah didesain dapat menghasilkan panjang basa amplifikasi yang

berbeda. Panjang basa yang dihasilkan primer 1 adalah 1280 bp sedangkan panjang produk amplifikasi primer 2 adalah 622 bp.

3.5 Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.6 berikut ini.



Gambar 3.6 Kerangka Konsep Penelitian